

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

(11) N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

2 726 472

(21) N° d'enregistrement national :

94 13306

(51) Int Cl<sup>6</sup> : A 61 K 39/39, C 12 N 15/31, 15/62(C 12 N 15/31,  
C 12 R 1:22)

(12)

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 07.11.94.

(71) Demandeur(s) : PIERRE FABRE MEDICAMENT —  
FR.

(30) Priorité :

(43) Date de la mise à disposition du public de la  
demande : 10.05.96 Bulletin 96/19.

(72) Inventeur(s) : BINZ HANS, BAUSSANT THIERRY,  
HAEUW JEAN FRANCOIS et NGUYEN THIEN  
NGOC.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : Se reporter à la fin du  
présent fascicule.

(73) Titulaire(s) :

(60) Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

(74) Mandataire : REGIMBEAU.

(54) PROTEINE PORTEUSE A EFFET ADJUVANT, COMPLEXE IMMUNOGENE LA CONTENANT, LEUR PROCEDE  
DE PREPARATION, SEQUENCE NUCLEOTIDIQUE ET VACCIN.

(57) L'invention concerne un produit adjuvant destiné à  
améliorer l'activité d'une molécule lors de l'administration à  
un hôte, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une  
partie de la protéine P40 de *Klebsiella pneumoniae* ou une  
protéine présentant au moins 80% d'homologie avec la  
protéine P40 de *Klebsiella pneumoniae*.

L'invention a également pour objet les séquences nu-  
cléotidiques codant pour ces peptides ou protéines et l'utili-  
sation de ces séquences à titre de médicament. Plus parti-  
culièrement, de telles séquences d'ADN peuvent être  
utilisées dans des compositions destinées à l'immunisation  
par voie intramusculaire ou intradermique.

FR 2 726 472 - A1



La présente invention concerne des adjuvants destinés à être associés à une molécule pour améliorer son activité, en particulier pour augmenter l'intensité de la réponse immunitaire. Elle concerne également des complexes contenant un tel adjuvant associé à une molécule active.

5 La molécule active peut notamment être une protéine, un peptide, un polysaccharide, un oligosaccharide ou un acide nucléique, ADN ou ARN.

La mise au point de vaccins parfaitement définis et dépourvus d'effets secondaires marqués, nécessite l'emploi d'antigènes vaccinants de faible masse moléculaire, tels que des peptides ou des oligosaccharides. Ces 10 antigènes de faible masse, mais aussi certains antigènes de masse moléculaire supérieure tels que les polysaccharides de la paroi bactérienne, ne peuvent induire seuls une réponse immunitaire durable et intense. Il est indispensable de lier ces antigènes, par voie chimique ou par génie génétique, à des protéines porteuses.

15 Les protéines porteuses, actuellement utilisées, sont de deux types :  
- les anatoxines tétanique et diphtérique : l'emploi trop fréquent de ces protéines porteuses risque d'aller à l'encontre d'une réponse intense contre l'haptène et risque de poser des problèmes d'immunotoxicologie,  
- un extrait de protéine membranaire de *Neisseria meningitidis* (OMPC) : est constitué par une protéine membranaire contaminée par des lipides et des LPS.

20 Le brevet EP- 267 204 a proposé l'utilisation d'une molécule de support destinée à être couplée à un immunogène, et consistant en une protéine de membrane d'*E. coli* ou de *Salmonella*.

25 La Demanderesse a démontré qu'une protéine extraite de la membrane externe de *Klebsiella pneumoniae* permet d'améliorer considérablement la réponse immunitaire à un antigène ou un haptène lorsqu'elle est administrée en même temps que celui-ci à un hôte. Plus particulièrement, une protéine OmpA, la protéine P40 de *K. pneumoniae*, peut être utilisée comme adjuvant dans des complexes immunogènes, où 30 elle est associée à un élément immunogène.

Les conjugués chimiques issus d'un couplage de peptides à la P40 donnent de bons résultats, et une évaluation de la réponse immunitaire montre des réponses en anticorps contre ces peptides supérieures à celles observées en utilisant les protéines porteuses de référence, KLH ou TT.

5 Toutefois, les antigènes peptidiques sont greffés de manière préférentielle sur la partie C-terminale de la séquence, partie de la molécule la plus immunogène, (Puohiniemi, R et al., 1990, Infect Immu. 58, 1691-1696. Ceci peut poser un problème sérieux pour les protéines de fusion contenant la séquence complète de P40. Ainsi, l'utilisation d'un  
10 fragment de la séquence supportant l'activité adjuvante, minimiserait davantage l'immunogénicité de la protéine porteuse et les risques liés à cette immunogénicité.

15 C'est pourquoi la présente invention a pour objet un complexe immunogène du type comprenant un élément immunogène, associé à un adjuvant augmentant l'intensité de la réponse immunitaire, caractérisé en ce que l'élément immunogène est un antigène ou un haptène, et en ce que l'adjuvant comprend au moins une partie de la protéine P40 de Klebsiella pneumoniae ou une protéine présentant au moins 80% d'homologie avec la protéine P40.

20 En particulier, l'invention a pour objet un adjuvant constitué d'une protéine ou d'un peptide présentant la séquence de P40实质iellement dépourvue des parties immunogènes.

Ces fragments de P40 selon l'invention sont notamment :

- la séquence de P40 dépourvue de la partie C terminale pérисplasmatique immunogène,
- une séquence contenant la 3ème et la 4ème boucle extramembranaire flanquant une séquence intramembranaire,
- une séquence contenant une boucle extramembranaire invariable et la séquence intramembranaire adjacente.

30 C'est pourquoi, l'un des objets de l'invention est un produit adjuvant qui consiste en la séquence comprise entre les amino-acides 1 à 179 de la protéine P40 de *K. pneumoniae*, ou une séquence présentant au moins 80% d'homologie avec la séquence comprise entre les amino-acides numérotés 1 et 179 de la séquence de la protéine P40 de *K. pneumoniae*.

Un autre objet de l'invention est un adjuvant qui consiste en la séquence comprise entre les amino-acides 108 à 179 de la protéine P40 de *K.pneumoniae* ou une séquence présentant au moins 80% d'homologie avec la séquence comprise entre les amino-acides numérotés 108 et 179 de la protéine P40 de *K. pneumoniae*.

Selon un autre aspect, l'invention a pour objet un adjuvant qui consiste en la séquence comprise entre les amino-acides numérotés 127 à 179 de la protéine P40 de *K. pneumoniae* ou une séquence présentant au moins 80% d'homologie avec la séquence comprise entre les amino-acides numérotés 127 à 179 de la protéine P40 de *K. pneumoniae*.

Les séquences ID n° 2, ID n° 4, ID n° 6 et ID n° 8 correspondent à des adjuvants selon l'invention. Cette protéine et ces peptides adjuvants peuvent notamment être préparés à partir de membranes de bactéries du genre *Klebsiella pneumoniae*. Le procédé comprend alors les étapes suivantes :

- a) précipitation des lipopolysaccharides par addition de détergent et d'un sel de cation divalent et récupération du surnageant,
- b) précipitation des protéines du surnageant et remise en suspension du culot,
- c) chromatographie de la suspension sur échangeur d'anions et récupération des fractions contenant le produit adjuvant,
- d) chromatographie sur échangeur de cations et récupération de la fraction contenant le produit adjuvant,
- e) concentration de la fraction obtenue à l'issue de l'étape d) pour récupérer un produit adjuvant sous forme de protéine ou de peptide, essentiellement dépourvu de liposaccharides.

Des étapes de dialyse peuvent avantageusement intervenir entre, respectivement, les étapes b) et c) et les étapes c) et d).

L'invention a également pour objet les complexes immunogènes pouvant être obtenus à partir des différents adjuvants.

L'adjuvant peut être associé à l'élément immunogène par couplage chimique.

Ce couplage covalent de l'haptène peptidique à l'adjuvant peut être effectué d'une façon bien connue dans la technique. Des réactifs appropriés à cette fin comprennent notamment les esters de N-succinimide, les carbodiimides, l'EEDQ (N-éthoxycarbonyl-2-éthoxy-1,2-dihydroquinoléine) et similaires.

On peut également fusionner par génie génétique le fragment de la protéine P40 en cause et l'élément immunogène.

La protéine de fusion obtenue entre le fragment de la protéine 40 et l'élément immunogène peut également être fusionnée, par génie 5 génétique à une protéine qui est un récepteur à une protéine sérique, en particulier à la sérumalbumine humaine.

L'élément immunogène, un antigène ou haptène, peut notamment provenir de virus ; on peut citer les protéines du RSV (Virus Respiratoire Syncitial) ou leurs fragments, par exemple la protéine G du RSV, ou 10 l'antigène de l'hépatite B.

Dans le cas de la protéine G du RSV, on peut utiliser la protéine totale ou ses fragments, éventuellement modifiés par mutagénèse ponctuelle ou délétion.

La Demanderesse a montré que l'administration d'un haptène 15 couplé à un fragment de la protéine P40 selon l'invention entraînait une augmentation susbtantiale de la réponse immunitaire, en limitant les risques de réactions à l'encontre de l'adjuvant lui-même.

Un procédé pour augmenter l'immunogénicité d'un antigène ou d'un haptène, caractérisé en ce qu'on associe ledit antigène ou haptène à 20 un adjuvant qui comprend tout ou partie de la séquence de la protéine P40 de *Klebsiella pneumoniae*, sous forme d'un complexe tel que défini précédemment fait également partie de l'invention.

L'invention a donc également pour objet un vaccin, caractérisé en ce qu'il contient un élément immunogène associé à un fragment de la 25 protéine P40 dépourvu d'une partie substantielle de la séquence C-terminale de la protéine P40 native.

Elle comprend également des compositions pharmaceutiques contenant un complexe formé entre un adjuvant et un élément immunogène, tel que défini précédemment et des excipients 30 pharmaceutiquement acceptables adaptés à son administration par voie parentérale et/ou orale.

L'invention a également pour objet les séquences nucléotidiques codant pour les peptides ou les protéines décrits précédemment, et l'utilisation de ces séquences à titre de médicament. Plus particulièrement, 35 de telles séquences d'ADN peuvent être utilisées dans des compositions destinées à l'immunisation par voie intramusculaire ou intradermrale.

Les exemples qui suivent sont destinés à illustrer l'invention sans aucunement en limiter la portée.

Dans ces exemples, on se référera aux figures suivantes :

5

**Figure 1** : Stratégie de clonage par amplification génique de P40.

**Figure 2** : Clonage de P40 dans pVABBG2ΔC.

**Figure 3** : Choix des différents fragments de P40.

**Figure 4** : Clonage de ΔP40G2ΔC dans pVABB

10

**Figure 5** : Réponse anticorps anti-peptidique G1ΔC après des immunisations avec différentes concentrations de P40ext-G1ΔC.

**Figure 6** : Réponse anticorps anti-peptidique G1ΔC obtenue avec différents schémas d'immunisation.

### 15 Exemple 1 : Isolement et purification de la protéine p40

#### Matériel et méthodes

20 La biomasse de *Klebsiella pneumoniae* (souche I-145, 40 g de cellules sèches) est ajustée à pH 2,5 à l'aide d'acide acétique pur.

Après addition de 1/2 volume d'une solution contenant 6% cétrimide, 60% éthanol, 1,5 M CaCl<sub>2</sub> dont le pH est ajusté à 2,5 avec de l'acide acétique, le mélange est placé sous agitation pendant 16 heures à température ambiante.

25 Après centrifugation 20 mn à 15000 g à 4° C, les protéines du surnageant sont précipitées à l'éthanol. Deux précipitations successives avec centrifugation intermédiaire (10 mn, 10000 g, 4° C) sont réalisées : de 20 à 50 % puis de 50 à 80%.

30 Les culots obtenus après la seconde précipitation sont remis en suspension dans une solution de zwittergent 3-14, 1%.

Après agitation 4 heures à température ambiante, le pH est ajusté à 6,5 à l'aide de NaOH 1N.

Une centrifugation du mélange pendant 20 mn à 10000 g à 4° C permet d'obtenir une fraction enrichie en protéines membranaires (fraction MP).

Les protéines de la fraction MP sont dialysées contre un tampon

5 Tris/HCl 20 mM pH 8,0 ; zwittergent 3-14, 0,1%. Le dialysat est déposé sur une colonne contenant un support de type échangeur d'anions forts (colonne de Ø = 50 mm x H = 250 mm, gel Biorad Macroprep High Q) équilibrée dans le tampon décrit ci-dessus. La protéine P40 est éluee pour une concentration de 50 mM en NaCl dans le tampon d'équilibration.

10 Les fractions contenant la P40 sont rassemblées et dialysées contre un tampon citrate 20 mM pH 3,0 ; zwittergent 3-14, 0,1%. Le dialysat est déposé sur une colonne contenant un support de type échangeur de cations forts (dimensions de la colonne : Ø = 25 mm x H = 160 mm, gel Biorad Macroprep High S) équilibrée dans le tampon citrate 20 mM pH 3,0,

15 zwittergent 3-14, 0,1 %. La protéine P40 est éluee pour une concentration 0,7 M en NaCl. Les fractions contenant la P40 sont rassemblées et concentrées par ultrafiltration à l'aide d'un système de filtration à flux tangentiel Minitan Millipore utilisé avec des plaques de membranes possédant un seuil de coupure 10 kDa.

20

### Résultats

Les fractions obtenues après chaque étape chromatographique sont analysées par SDS-PAGE afin de rassembler celles contenant la protéine

25 P40.

Les quantités de protéines sont mesurées par la méthode de Lowry (tableau 1).

**Tableau 1** : Tableau récapitulatif des quantités de protéine et LPS des fractions obtenues pour les différentes étapes du procédé de purification de la protéine P40 (n.d. = non déterminé)

		Protéines	Rendement	LPS
10	Biomasse	40 g	-	n.d.
	Fraction MP	900 mg	2,25 %	n.d.
15	Fraction enrichie en P40	400 mg	1 %	10 %
	Protéine P40	130 mg	0,3 %	< 1%

20 La pureté et l'homogénéité de la protéine P40 sont estimées par SDS-PAGE

Après l'étape de chromatographie d'échange de cations, la protéine P40 est dépourvue du contaminant majeur présent dans la fraction MP (la protéine présentant une masse moléculaire apparente de 18 kDa) et présente un degré de pureté supérieur à 95%. D'autre part, cette étape de purification permet l'élimination des lipopolysaccharides. Cette étape de purification n'existe pas dans le procédé de purification précédemment présenté.

Le profil électrophorétique de la P40 révèle plusieurs bandes. Ces bandes sont reconnues après immunoblot par des anticorps monoclonaux anti-P40 obtenus chez la souris. La bande majeure supérieure correspond à la protéine dénaturée (par le traitement à 100 ° C, 15 min. en présence de SDS), et la bande mineure inférieure à la protéine sous sa forme native.

La P40 est en effet une protéine dite modifiable par la chaleur (heat-modifiable), et cette propriété a été vérifiée à l'aide d'une cinétique de chauffage à 100° C en présence de SDS. Sans chauffage la protéine sous forme native présente une structure en feuillets  $\beta$  qui fixe plus de SDS et migre donc plus loin vers l'anode que la forme dénaturée (dénaturation complète après 5 min. à 100 ° C) qui présente une structure en hélices  $\alpha$  (KELLER, K. B. 1978, J. Bacteriol., 134, 1181-1183).

La contamination par les lipopolysaccharides (LPS) est estimée par dosage par chromatographie en phase gazeuse de l'acide  $\beta$ -hydroxymyristique, acide gras marqueur des LPS de Klebsiella pneumoniae (tableau 1).

Cette méthode ne peut être utilisée que pour approcher la teneur en LPS des échantillons issus des différentes étapes de purification.

La quantité d'acide  $\beta$ -hydroxymyristique présente dans la fraction P40 après chromatographie d'échange de cations étant inférieure au seuil de quantification du dosage, on peut estimer que la quantité de LPS résiduel est inférieure à 1%.

### Exemple 2 : Clonage et expression de la protéine P40

20

#### Matériel et méthode

##### Souches bactériennes

25

\* E. coli : RV 308 : souche ATCC 31608 (Maurer, R. et al., 1980, J. Mol. Biol., 139, 147-161).

30

\* K. pneumoniae : IP 145 : souche C.I.B.P.F - Brevet d'invention déposé le 19 janvier 1981.

**Vecteurs**

5 \* pRIT 28 (Hultman T. et al., 1988, Nucléosides Nucléotides, 7 : 629-638) : vecteur de clonage et de séquençage possédant le gène de résistance à l'ampicilline, les origines de réPLICATION d'E. coli et du phage F1 ainsi qu'une portion du gène lac-Z d'E. coli ( $\beta$ -galactosidase).

\* pVABB : vecteur d'expression de fusion de gène.

**10 Solutions****\* Amplification génique**

15 Tampon de lyse : 25 mM Taps pH 9,3  
2 mM MgCl<sub>2</sub>

Tampon d'amplification : 25 mM Taps pH 9,3  
2 mM MgCl<sub>2</sub>  
Tween 20 0,1 %  
200 mM dNTP.

**\* Purification des protéines**

25 TST (20X) : Tris base 0,5 M  
HCl 0,3 M  
NaCl 4 M  
Tween 20 1 %  
EDTA 20 mM

30 Tampon de lavage : Tris HCl 50 mM pH 8,5  
MgCl<sub>2</sub> 5 mM

Solution de dénaturation : Gua-HCl 7,8 M  
Tris-HCl 28 mM pH 8,5

Solution de renaturation :	Gua-HCl	0,5 M	
	Tris-HCl	25 mM	pH 8,5
	NaCl	150 mM	
	Tween 20	0,05 %	

5

### Synthèse des oligonucléotides

Les amores nucléotidiques ont été déterminées à partir de la partie de la séquence publiée de l'OMPA de *Klebsiella pneumoniae* (Lawrence, J.G. et al., 1991, *J. Gen. Microbiol.*, 137: 1911-1921) de la séquence consensus issue de l'alignement des séquences de 5 OMPA d'entérobactéries (*E. coli*, *S. typhimurium*, *S. marcescens*, *S. dysenteriae*, *E. aeroginosae*), ainsi que des séquences de peptides obtenus par séquençage manuel.

Les oligonucléotides ont été synthétisés selon la méthode chimique des phosphoramidites sur l'appareil "Gene Assembler Plus" de Pharmacia.

### Amplification génique par PCR du gène P40

L'ADN de l'OMPA de *Klebsiella pneumoniae* a été amplifié de la manière suivante.

Une colonie de *Klebsiella pneumoniae* est lysée dans 10 µl de tampon de lyse par chauffage à 95° C pendant 5 minutes.

1 µl de cette solution sert de source d'ADN pour les réactions d'amplification.

Celles-ci sont réalisées dans 100 µl de tampon d'amplification, avec 5 pmoles de chaque amorce et une unité d'enzyme Taq polymérase (Perkin Elmer Cetus). Chaque cycle comprend une étape de dénaturation de 30 secondes à 95° C suivie d'une hybridation de l'amorce à l'ADN et d'une extension d'une minute à 72° C. 30 cycles sont ainsi effectués à l'aide d'un thermocycleur "Gen Amp PCR" 9000 Perkin Elmer Cetus.

Les PCR suivantes sont réalisées à partir des fragments d'ADN amplifiés précédemment.

Les fragments d'ADN amplifiés sont ensuite digérés et liés au vecteur pRIT 28.

5

### Séquençage

Les fragments ainsi clonés sont séquencés sur un séquenceur automatique 373 DNA Séquenceur d'Applied Biosystem. Les réactions de séquençage sont réalisées à l'aide du kit "dye Terminator" selon les recommandations du fournisseur (Applied Biosystem) soit sur de l'ADN double brin obtenu après amplification génique ou issu de maxiprep soit sur de l'ADN simple brin issu de fragments PCR dénaturés (Hultman, T. et al, 1989, Nucleic Acids Rev. 17 : 4937-4946).

15

### Expression de la protéine

Le gène entier de P40 est cloné dans le vecteur d'expression pVABB. Ce vecteur permet d'adoindre une queue d'affinité "BB" à P40 ; B étant la partie de la protéine G du streptocoque qui lié la serumalbumine (Nygren, P.A. et al, 1988, J. Mol. Recognit. 1, 69-74).

Les souches d'E. coli RV308 transformées par le vecteur pVABBP40 sont mises à cultiver une nuit à 37° C sous agitation, dans 100 ml de TSB complémenté en extrait de levure, en ampicilline (200 µg/ml) en tétracycline (8 µg/ml) et en tryptophane (100 µg/ml). Le lendemain, une culture à D0 = 1 pour une longueur d'onde de 580 nm est préparée dans du TSB + extraits de levure + ampi + tetra.

Après 10 minutes de culture, l'expression de la protéine est induite par addition d'IAA à (25 µg/ml) dans le milieu. La culture est centrifugée à 30 4° C à 2460 g pendant 10 minutes.

Le culot est repris par 20 ml de TST 1 x pH 7,4, et la solution est alors centrifugée à 4° C à 23000 g pendant 30 minutes.

Le surnageant est passé sur HSA Sépharose ce qui permet d'isoler les protéines dites solubles. Le culot est lavé avec du tampon de lavage puis 5 centrifugé à 23000 g à 4° C pendant 30 minutes. Le culot renfermant les corps d'inclusion est alors repris par 900 µl d'une solution dénaturante + 100 µl de Dithiothreitol 10 mM et incubé 2 heures à 37° C.

La solution est ensuite incubée 1 nuit à température ambiante, sous agitation, dans 100 ml de tampon de renaturation puis centrifugée à 23 000 g à 4°C pendant 30 minutes.

10 Le surnageant est passé sur HSA Sépharose. Dans les deux cas les protéines fixées sont éluées avec de l'acide acétique 0,5 M pH 2,8 et collectées par fraction de 1 ml. Les fractions collectées sont ensuite analysées sur gel 15 d'électrophorèse en SDS-PAGE et par Immuno blot.

## Résultats

20 Le clonage du gène a été effectué en trois temps selon la stratégie présentée sur la figure 1.

Dans un premier temps, nous avons confirmé la partie de la séquence publiée à l'exception d'un T à la place d'un A en position 103.

Puis nous avons déterminé la séquence en 3' du gène et enfin celle en 5'.

25 Le gène entier a été obtenu par fusion des deux parties 8/4 et 3/14 puis cloné dans le vecteur pRIT 28. La séquence est la séquence id n° 1.

La protéine est exprimée sous la forme BBP40.

Elle est essentiellement obtenue à partir des corps d'inclusion. Pour 30 une culture de 200 ml, on purifie une quinzaine de milligrammes de protéine.

Le profil électrophorétique montre que BBP40, obtenue après dénaturation, est d'une grande pureté. Le poids moléculaire apparent, correspond au poids théorique calculé qui est de 63 kDa.

La caractérisation en Immuno blot montre que la protéine purifiée est bien reconnue par un sérum de lapin anti-P40.

**Exemple 3 : Protéine de fusion BBP40G2ΔC, sous groupe a**

5

Un oligonucléotide correspondant à la partie N Terminale déletée du codon stop du gène, a été synthétisé.

La partie en 5' a été amplifiée par PCR, purifiée, clonée dans le vecteur pRIT 28 et séquencée, selon la méthodologie décrite dans l'exemple  
10 2

Dans un deuxième temps, les deux parties du gène ont été fusionnées et clonées dans le vecteur pVABBG2ΔC (figure n° 2). G2ΔC représente la séquence d'un fragment de 101 amino-acides de la protéine G du virus respiratoire syncytial G (130-230).

15 Des bactéries E. coli de la souche RV308 sont ensuite transformées avec le vecteur pVABBG2ΔC.

Les protéines produites sont purifiées comme déjà décrit pour BBP40.

20

### Résultats

25

La protéine BBP40G2ΔC est essentiellement obtenue à partir des corps d'inclusion. On purifie une douzaine de mg de protéines à partir de 200 ml de milieu de culture.

En électrophorèse, la protéine est assez pure.

30

La masse moléculaire apparente correspond à la masse théorique calculée qui est de 75 kDa.

**Exemple 4 : Clonage et expression de trois fragments de P40**

30

### Matériel et méthodes

### Les oligonucléotides

Trois oligonucléotides complémentaires de la séquence de P40 ont été synthétisés : 16-17-18 (cf. figure 3).

5 Des parties du gène déterminées ont ensuite été amplifiées en PCR à partir de l'ADN d'une miniprep (protocole Applied) de pRIT 28 P40.

On a ainsi pu cloner la partie du gène correspondant à la totalité de la partie transmembranaire (8/17, baptisé fragment n° 8) à deux boucles externes-deux portions transmembranaires (16/17, baptisé fragment 10 n°16) et 1 boucle externe deux portions transmembranaires (18/17, baptisé fragment n° 18).

Les fragments d'ADN ainsi amplifiés sont digérés puis isolés et liqués au vecteur pRIT 28 et séquencés (cf. BBP40 clonage de P40).

### 15 La protéine de fusion BBAP40G2ΔC

Le gène G2ΔC est digéré à partir du vecteur pRIT 28 G2ΔC puis liqué au vecteur digéré pRIT 28 ΔP40 (ΔP40 représente un des fragments de P40).

Ensuite, l'ensemble ΔP40G2ΔC est digéré et cloné dans pVABB (cf. 20 figure 4).

Les trois protéines hybrides sont exprimées selon le protocole décrit pour BBP40.

### Résultats

25

Tout comme BBP40 et BBP40G2ΔC, BB8G2ΔC est obtenu essentiellement à partir des corps d'inclusion. Une culture de 400 ml donne une dizaine de mg de protéines.

Par contre, les protéines BB18G2ΔC, et BB16G2ΔC se retrouvent 30 majoritairement à l'étape de sonication, sous forme soluble. Dans les deux cas, on obtient une dizaine de mg/400 ml de culture.

Ces protéines ont été caractérisées en électrophorèse SDS-PAGE.  
Leur masse moléculaire correspond à la masse théorique calculée :

5

BB8G2ΔC	58,03 kDa
BB16G2ΔC	46,5 kDa
BB18G2ΔC	45,5 kDa

Les trois hybrides sont reconnus aussi bien par un anticorps polyclonal anti- G2 qu'anti P40 en Western Blot.

10

### Exemple 5

15

#### 1. Effets de la protéine P40 sur des cellules du système immunitaire

20

##### 1.a. Lymphocytes B

25

On a injecté par voie sous-cutanée à des souris BALB/c (5 par groupe) aux jours 0 et 21, 30 µg de P40 obtenus par extraction de la membrane (P40 ext) ou par recombinaison génétique (P40 rec, c'est-à-dire BBP40). Les immunisations ont été effectuées sans aucun adjuvant. 10 jours après la dernière immunisation, la réponse en anticorps anti-P40ext a été évaluée sur les sérum individuels par la méthode ELISA. Le tableau 2 donne la moyenne des titres obtenus sur 5 échantillons. Les contrôles négatifs ne contenaient pas d'anticorps anti-P40ext.

30

#### Tableau 2 : réponse anticorps anti-P40ext

Immunisations avec:	xtP40	recP40
Titres d'anticorps :	87040	112640

Dans ces conditions expérimentales, la P40rec est aussi immunogène que la P40ext. Ces deux protéines contiennent donc des épitopes B qui interagissent avec les lymphocytes B.

### 5 1.b. Lymphocytes T

La réaction d'hypersensibilité retardée (HSR) à la P40ext a été mesurée par le test du gonflement différé du coussinet. Des souris BALB/c (5 par groupe) ont été sensibilisées par voie sous-cutanée avec 100 µg de P40ext sans le moindre adjuvant. Après 6 à 10 jours, les souris ont été stimulées par voie sous-cutanée avec 100 µg de P40ext/20 µl dans le coussinet postérieur droit, alors que le coussinet postérieur gauche recevait du PBS. 24 heures plus tard, le gonflement du coussinet a été mesuré. On n'observe pas d'hypersensibilité retardée dans le contrôle négatif (5 souris non sensibilisées).

Tableau 3 : réaction d'hypersensibilité retardée induite par P40ext, mesurée par le gonflement du coussinet (en mm)

	J6		J10	
	BALB/c	C57Bl/6	BALB/c	C57Bl/6
	7,9	7,8	7,5	7,4

Les résultats montrés dans le tableau 3 indiquent que les souris immunisées avec P40ext produisent des réactions d'hypersensibilité retardée hautement quantitatives dans le coussinet. La réaction HSR reflète la réponse immunitaire à médiation cellulaire, nécessitant des cellules Th1. On peut en conclure que P40 ext contient au moins un épitope T qui est capable de favoriser la réponse Th1, sans restriction MHC.

### 1.3. Macrophages

5 L'effet de P40ext sur des macrophages a été déterminé par leur production de nitrite. Des cellules RAW 264,7, qui sont des monocytes-macrophages de souris, ont été incubées 72 heures à 37° C en présence de différentes concentrations de P40ext. La quantité de nitrites dans le surnageant des cultures cellulaires a été mesurée par un dosage colorimétrique avec le réactif de Griess-Ilosvay.

10 La production de nitrite reflète l'activation des macrophages, et joue un rôle crucial dans l'activité anti-microbienne et anti-tumorale de ces cellules. Les données obtenues montrent que P40ext stimule la production de nitrite des cellules RAW 264,7, démontrant que P40ext active les macrophages.

15 2. P40 est un porteur à effet adjuvant pour un peptide (G1ΔC)

#### 2.1. Comparaison de P40ext avec d'autres supports

20 Le peptide utilisé est G1ΔC, un peptide obtenu à partir de la protéine G du RSV : (G174-187 ΔC) Trudel et al., 1991, J. Virol. 185 : 749-757.

#### Cinétique de la réponse immunitaire contre G1 ΔC

25 Des souris C57Bl/6 (5 par groupe) sont immunisées avec G1 ΔC sous différentes formes selon un schéma d'immunisation identique. Les réponses anticorps induites par les différentes formes de G1 ΔC sont comparées dans le temps : 7, 17, 28, 35, 42 jours après le début de l'expérience.

30 La réponse anti-G1 ΔC est significativement plus élevée et plus rapide lorsque les souris sont immunisées avec P40/G1 ΔC que les immunisations plus classiques TT/G1 ΔC et KLH/G1 ΔC+AF. Une seule injection de P40/G1 ΔC permet d'obtenir, en 7 jours, un titre d'anticorps anti-G1 ΔC de 1000. Ce titre est obtenu avec TT/G1 ΔC+AF en 28 jours. La réponse maximum (titre = 1/380000), obtenue après trois injections, en 28

jours, est environ 30 fois supérieure à celle obtenue avec KLH/G1  $\Delta$ C +AF et 70 fois supérieure à celle obtenue avec TT/G1  $\Delta$ C. Le titre en anticorps anti-G1 se maintient sans faiblir jusqu'au jour 42.

## 5 Conclusion

Le couplage chimique du peptide G1  $\Delta$ C sur la protéine P40 a permis d'induire une réponse anti-G1  $\Delta$ C aussi importante que les modèles de référence KLH/G1  $\Delta$ C+AF ou TT/G1  $\Delta$ C.

10 Les résultats obtenus montrent que P40ext est une molécule porteuse à effet adjuvant pour G1 $\Delta$ C : P40ext est meilleure que la toxine tétanique et aussi bonne que l'association KLH + adjuvant de Freund.

### 2.1. Distribution isotypique des anticorps anti-peptide G1 $\Delta$ C

15 Les isotypes des sérum obtenus pendant les expériences décrites ci-dessus ont été déterminés par ELISA. Le tableau 4 présente la moyenne des valeurs de A450 de 5 sérum individuels testés à la dilution 1/250.

20 Tableau 4 : distribution isotypique des anticorps anti-peptide G1 $\Delta$ C

	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3
25 A450 (dil.1/250)	2,892	1,212	2,970	0,209

30 On a montré que la sécrétion d'isotype d'anticorps est régulée par des sous-ensembles de cellules Th spécifiques d'un antigène qui peuvent être divisés en deux sous-ensembles Th1 et Th2. Les clones Th1 produisent de l'IL-2 et IFN-gamma, et des lymphotoxines, alors que les clones Th2 produisent

de l'IL-4 et de l'IL-5. Les clones de Th1 et de Th2 induisent spécifiquement la sécrétion par les cellules B spécifiques d'un antigène, respectivement d'IgG2a + IgG3 et d'IgG1 + IgG2b + IgE. Les données présentées dans le tableau 4 montrent que IgG1 et IgG2b sont les deux isotypes majeurs des anticorps anti G1ΔC, l'IgG2a étant également représenté. On peut en conclure que chez les souris C57B1/6, P40-G1ΔC provoque une réponse Th2 supérieure à la réponse Th1.

## 2.2. Etude dose-effet

10

On a injecté par voie sous-cutanée à des souris BALB/c (5 par groupe) différentes concentrations de P40ext-G1ΔC, aux jours 0, 10 et 21. Une semaine après la dernière immunisation, des échantillons de sang sont prélevés et la réponse anticorps anti-peptide G1ΔC est estimée sur les sérum individuels par ELISA. La moyenne des titres de 5 échantillons est effectuée.

La figure 5 montre le rapport dose-effet de P40ext-G1ΔC. Une réponse anticorps anti-peptide G1ΔC est obtenue avec 1 µg de P40ext-G1ΔC. Les titres en anticorps les plus élevés sont observés avec 10 à 50 µg de P40ext-G1ΔC.

## 2.4. Détermination du schéma d'immunisation optimale

On a injecté par voie sous-cutanée à des souris BALB/c (5 par groupe) P40ext-G1ΔC (équivalent à 10 µg de G1ΔC) aux jours indiqués sur la figure 6. La réponse anticorps anti-peptide G1ΔC est déterminée sur les sérum individuels par ELISA. 4 schémas d'immunisations ont été testés : une injection, deux injections aux jours 0 et 14, ou aux jours 0 et 21, et trois injections aux jours 0, 21 et 40. La réponse anticorps anti-peptide anti-G1ΔC la plus élevée est obtenue avec trois injections.

**3. P40ext est un adjuvant efficace pour un antigène protéique (BBG2ΔC)**

On a injecté par voie sous-cutanée à des souris BALB/c (5 par groupe) BBG2ΔC conjugué chimiquement à P40ext (équivalent à 10 µg de G2 ΔC) aux jours 0 et 21. Dix jours plus tard, la réponse anticorps anti-G2ΔC est déterminée dans les sérums individuels par ELISA. Les moyennes des titres de 5 échantillons sont données dans le tableau 5. Le contrôle négatif ne contenait pas d'anticorps anti-G2ΔC.

10

**Tableau 5 : effet adjuvant de P40ext sur un antigène protéique**

	Titre en anticorps anti-G2ΔC
BBG2ΔC	160
BBG2ΔC + adjuvant de Freund	2051200
extP40-BBG2ΔC	29800

BBG2ΔC est faiblement immunogène. L'utilisation d'adjuvant de Freund augmente le titre en anticorps anti-G2ΔC. Quand BBG2ΔC est conjugué par voie chimique à P40ext, la réponse anticorps anti-G2ΔC est augmentée d'environ 200 fois. P40ext est donc un bon adjuvant pour un antigène protéique.

**25 4. Activité adjuvante des fragments de P40**

On a injecté par voie sous-cutanée à des souris BALB/c (5 par groupe) au jour 0 et stimulé au jour 21 par les protéines recombinantes suivantes : BBG2ΔC avec ou sans adjuvant de Freund (AF), la protéine de fusion BBP40G2ΔC, la protéine de fusion contenant le fragment de P40 n° 8 (BB8G2ΔC), la protéine de fusion contenant le fragment de P40 n° 16 (BB16G2ΔC) et la protéine de fusion contenant le fragment de P40 n° 18 (BB18G2ΔC) ( 10 µg équivalent G2 ΔC).

Au jour 31, les réponses anticorps anti-G2ΔC et anti-P40 sont déterminées par ELISA dans les sérums individuels. La moyenne des titres de 5 sérums individuels est effectuée. Les contrôles négatifs ne contenaient pas d'anticorps anti-G2ΔC.

5

**Tableau 6 : effet adjuvant des fragments recombinants de P40**

	Titre en anticorps anti-G2ΔC	Titre en anticorps anti-P40
BBG2ΔC	200	-
BBG2ΔC + AF	163 840	-
BBP40G2ΔC	56 320	266 240
BB8G2ΔC	112 640	33 280
BB16G2ΔC	6 480	180
BB18G2ΔC	17 280	2 800

15

Dans cette expérience, on montre que les fragments de P40 choisis supportent les propriétés adjuvantes de la protéine entière, surtout les fragments n° 8 et n° 18. La réponse anticorps anti-P40 est 20 considérablement réduite en utilisant les fragments de P40.

## LISTE DE SEQUENCES

## (1) INFORMATION GENERALE:

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 8

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 1008 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

GCT	CCG	AAA	GAT	AAC	ACC	TGG	TAT	GCA	GGT	GGT	AAA	CTG	GGT	TGG	TCC	48
Ala	Pro	Lys	Asp	Asn	Thr	Trp	Tyr	Ala	Gly	Gly	Lys	Leu	Gly	Trp	Ser	
1					5						10				15	
CAG	TAT	CAC	GAC	ACC	GGT	TTC	TAC	GGT	AAC	GGT	TTC	CAG	AAC	AAC	AAC	96
Gln	Tyr	His	Asp	Thr	Gly	Phe	Tyr	Gly	Asn	Gly	Phe	Gln	Asn	Asn	Asn	
20						25						30				
GGT	CCG	ACC	CGT	AAC	GAT	CAG	CTT	GGT	GCT	GGT	GCG	TTC	GGT	GGT	TAC	144
Gly	Pro	Thr	Arg	Asn	Asp	Gln	Leu	Gly	Ala	Gly	Ala	Phe	Gly	Gly	Tyr	
35						40						45				
CAG	GTT	AAC	CCG	TAC	CTC	GGT	TTC	GAA	ATG	GGT	TAT	GAC	TGG	CTG	GGC	192
Gln	Val	Asn	Pro	Tyr	Leu	Gly	Phe	Glu	Met	Gly	Tyr	Asp	Trp	Leu	Gly	
50						55						60				
CGT	ATG	GCA	TAT	AAA	GGC	AGC	GTT	GAC	AAC	GGT	GCT	TTC	AAA	GCT	CAG	240
Arg	Met	Ala	Tyr	Lys	Gly	Ser	Val	Asp	Asn	Gly	Ala	Phe	Lys	Ala	Gln	
65						70						75			80	
GGC	GTT	CAG	CTG	ACC	GCT	AAA	CTG	GGT	TAC	CCG	ATC	ACT	GAC	GAT	CTG	288
Gly	Val	Gln	Leu	Thr	Ala	Lys	Leu	Gly	Tyr	Pro	Ile	Thr	Asp	Asp	Leu	
85												90		95		
GAC	ATC	TAC	ACC	CGT	CTG	GGC	GGC	ATG	GTT	TGG	CGC	GCT	GAC	TCC	AAA	336
Asp	Ile	Tyr	Thr	Arg	Leu	Gly	Gly	Met	Val	Trp	Arg	Ala	Asp	Ser	Lys	
100												105		110		
GGC	AAC	TAC	GCT	TCT	ACC	GGC	GTT	TCC	CGT	AGC	GAA	CAC	GAC	ACT	GGC	384
Gly	Asn	Tyr	Ala	Ser	Thr	Gly	Val	Ser	Arg	Ser	Glu	His	Asp	Thr	Gly	
115												120		125		

GTT TCC CCA GTA TTT GCT GGC GGC GTA GAG TGG GCT GTT ACT CGT GAC 432  
 Val Ser Pro Val Phe Ala Gly Gly Val Glu Trp Ala Val Thr Arg Asp  
 130 135 140  
 ATC GCT ACC CGT CTG GAA TAC CAG TGG GTT AAC AAC ATC GGC GAC GCG 480  
 Ile Ala Thr Arg Leu Glu Tyr Gln Trp Val Asn Asn Ile Gly Asp Ala  
 145 150 155 160  
 GGC ACT GTG GGT ACC CGT CCT GAT AAC GGC ATG CTG AGC CTG GGC GTT 528  
 Gly Thr Val Gly Thr Arg Pro Asp Asn Gly Met Leu Ser Leu Gly Val  
 165 170 175  
 TCC TAC CGC TTC GGT CAG GAA GAT GCT GCA CCG GTT GTT GCT CCG GCT 576  
 Ser Tyr Arg Phe Gly Gln Glu Asp Ala Ala Pro Val Val Ala Pro Ala  
 180 185 190  
 CCG GCT CCG GCT CCG GAA GTG GCT ACC AAG CAC TTC ACC CTG AAG TCT 624  
 Pro Ala Pro Ala Pro Glu Val Ala Thr Lys His Phe Thr Leu Lys Ser  
 195 200 205  
 GAC GTT CTG TTC AAC TTC AAC AAA GCT ACC CTG AAA CCG GAA GGT CAG 672  
 Asp Val Leu Phe Asn Phe Asn Lys Ala Thr Leu Lys Pro Glu Gly Gln  
 210 215 220  
 CAG GCT CTG GAT CAG CTG TAC ACT CAG CTG AGC AAC ATG GAT CCG AAA 720  
 Gln Ala Leu Asp Gln Leu Tyr Thr Gln Leu Ser Asn Met Asp Pro Lys  
 225 230 235 240  
 GAC GGT TCC GCT GTT CTG GGC TAC ACC GAC CGC ATC GGT TCC GAA 768  
 Asp Gly Ser Ala Val Val Leu Gly Tyr Thr Asp Arg Ile Gly Ser Glu  
 245 250 255  
 GCT TAC AAC CAG CAG CTG TCT GAG AAA CGT GCT CAG TCC GTT GTT GAC 816  
 Ala Tyr Asn Gln Gln Leu Ser Glu Lys Arg Ala Gln Ser Val Val Asp  
 260 265 270  
 TAC CTG GTT GCT AAA GGC ATC CCG GCT GGC AAA ATC TCC GCT CGC GGC 864  
 Tyr Leu Val Ala Lys Gly Ile Pro Ala Gly Lys Ile Ser Ala Arg Gly  
 275 280 285  
 ATG GGT GAA TCC AAC CCG GTT ACT GGC AAC ACC TGT GAC AAC GTG AAA 912  
 Met Gly Glu Ser Asn Pro Val Thr Gly Asn Thr Cys Asp Asn Val Lys  
 290 295 300  
 GCT CGC GCT GCC CTG ATC GAT TGC CTG GCT CCG GAT CGT CGT GTA GAG 960  
 Ala Arg Ala Ala Leu Ile Asp Cys Leu Ala Pro Asp Arg Arg Val Glu  
 305 310 315 320  
 ATC GAA GTT AAA GGC TAC AAA GAA GTT GTA ACT CAG CCG GCG GGT TAA 1008  
 Ile Glu Val Lys Gly Tyr Lys Glu Val Val Thr Gln Pro Ala Gly  
 325 330 335

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 335 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

Ala Pro Lys Asp Asn Thr Trp Tyr Ala Gly Gly Lys Leu Gly Trp Ser  
 1 5 10 15

Gln Tyr His Asp Thr Gly Phe Tyr Gly Asn Gly Phe Gln Asn Asn Asn  
 20 25 30

Gly Pro Thr Arg Asn Asp Gln Leu Gly Ala Gly Ala Phe Gly Gly Tyr  
 35 40 45

Gln Val Asn Pro Tyr Leu Gly Phe Glu Met Gly Tyr Asp Trp Leu Gly  
 50 55 60

Arg Met Ala Tyr Lys Gly Ser Val Asp Asn Gly Ala Phe Lys Ala Gln  
 65 70 75 80

Gly Val Gln Leu Thr Ala Lys Leu Gly Tyr Pro Ile Thr Asp Asp Leu  
 85 90 95

Asp Ile Tyr Thr Arg Leu Gly Gly Met Val Trp Arg Ala Asp Ser Lys  
 100 105 110

Gly Asn Tyr Ala Ser Thr Gly Val Ser Arg Ser Glu His Asp Thr Gly  
 115 120 125

Val Ser Pro Val Phe Ala Gly Gly Val Glu Trp Ala Val Thr Arg Asp  
 130 135 140

Ile Ala Thr Arg Leu Glu Tyr Gln Trp Val Asn Asn Ile Gly Asp Ala  
 145 150 155 160

Gly Thr Val Gly Thr Arg Pro Asp Asn Gly Met Leu Ser Leu Gly Val  
 165 170 175

Ser Tyr Arg Phe Gly Gln Glu Asp Ala Ala Pro Val Val Ala Pro Ala  
 180 185 190

Pro Ala Pro Ala Pro Glu Val Ala Thr Lys His Phe Thr Leu Lys Ser  
 195 200 205

Asp Val Leu Phe Asn Phe Asn Lys Ala Thr Leu Lys Pro Glu Gly Gln  
 210 215 220

Gln Ala Leu Asp Gln Leu Tyr Thr Gln Leu Ser Asn Met Asp Pro Lys  
 225 230 235 240  
 Asp Gly Ser Ala Val Val Leu Gly Tyr Thr Asp Arg Ile Gly Ser Glu  
 245 250 255  
 Ala Tyr Asn Gln Gln Leu Ser Glu Lys Arg Ala Gln Ser Val Val Asp  
 260 265 270  
 Tyr Leu Val Ala Lys Gly Ile Pro Ala Gly Lys Ile Ser Ala Arg Gly  
 275 280 285  
 Met Gly Glu Ser Asn Pro Val Thr Gly Asn Thr Cys Asp Asn Val Lys  
 290 295 300  
 Ala Arg Ala Ala Leu Ile Asp Cys Leu Ala Pro Asp Arg Arg Val Glu  
 305 310 315 320  
 Ile Glu Val Lys Gly Tyr Lys Glu Val Val Thr Gln Pro Ala Gly  
 325 330 335

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 537 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

GCT CCG AAA GAT AAC ACC TGG TAT GCA GGT GGT AAA CTG GGT TGG TCC 48  
 Ala Pro Lys Asp Asn Thr Trp Tyr Ala Gly Gly Lys Leu Gly Trp Ser  
 1 5 10 15  
 CAG TAT CAC GAC ACC GGT TTC TAC GGT AAC GGT TTC CAG AAC AAC AAC 96  
 Gln Tyr His Asp Thr Gly Phe Tyr Gly Asn Gly Phe Gln Asn Asn Asn  
 20 25 30  
 GGT CCG ACC CGT AAC GAT CAG CTT GGT GCT GGT GCG TTC GGT GGT TAC 144  
 Gly Pro Thr Arg Asn Asp Gln Leu Gly Ala Gly Ala Phe Gly Gly Tyr  
 35 40 45  
 CAG GTT AAC CCG TAC CTC GGT TTC GAA ATG GGT TAT GAC TGG CTG GGC 192  
 Gln Val Asn Pro Tyr Leu Gly Phe Glu Met Gly Tyr Asp Trp Leu Gly  
 50 55 60  
 CGT ATG GCA TAT AAA GGC AGC GTT GAC AAC GGT GCT TTC AAA GCT CAG 240  
 Arg Met Ala Tyr Lys Gly Ser Val Asp Asn Gly Ala Phe Lys Ala Gln  
 65 70 75 80

GGC GTT CAG CTG ACC GCT AAA CTG GGT TAC CCG ATC ACT GAC GAT CTG	288		
Gly Val Gln Leu Thr Ala Lys Leu Gly Tyr Pro Ile Thr Asp Asp Leu			
85	90	95	
GAC ATC TAC ACC CGT CTG GGC GGC ATG GTT TGG CGC GCT GAC TCC AAA	336		
Asp Ile Tyr Thr Arg Leu Gly Gly Met Val Trp Arg Ala Asp Ser Lys			
100	105	110	
GGC AAC TAC GCT TCT ACC GGC GTT TCC CGT AGC GAA CAC GAC ACT GGC	384		
Gly Asn Tyr Ala Ser Thr Gly Val Ser Arg Ser Glu His Asp Thr Gly			
115	120	125	
GTT TCC CCA GTA TTT GCT GGC GGC GTA GAG TGG GCT GTT ACT CGT GAC	432		
Val Ser Pro Val Phe Ala Gly Gly Val Glu Trp Ala Val Thr Arg Asp			
130	135	140	
ATC GCT ACC CGT CTG GAA TAC CAG TGG GTT AAC AAC ATC GGC GAC GCG	480		
Ile Ala Thr Arg Leu Glu Tyr Gln Trp Val Asn Asn Ile Gly Asp Ala			
145	150	155	160
GGC ACT GTG GGT ACC CGT CCT GAT AAC GGC ATG CTG AGC CTG GGC GTT	528		
Gly Thr Val Gly Thr Arg Pro Asp Asn Gly Met Leu Ser Leu Gly Val			
165	170	175	
TCC TAC CGC	537		
Ser Tyr Arg			

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 179 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

Ala Pro Lys Asp Asn Thr Trp Tyr Ala Gly Gly Lys Leu Gly Trp Ser  
1 5 10 15

Gln Tyr His Asp Thr Gly Phe Tyr Gly Asn Gly Phe Gln Asn Asn Asn  
20 25 30

Gly Pro Thr Arg Asn Asp Gln Leu Gly Ala Gly Ala Phe Gly Gly Tyr  
35 40 45

Gln Val Asn Pro Tyr Leu Gly Phe Glu Met Gly Tyr Asp Trp Leu Gly  
50 55 60

Arg Met Ala Tyr Lys Gly Ser Val Asp Asn Gly Ala Phe Lys Ala Gln  
65 70 75 80

Gly Val Gln Leu Thr Ala Lys Leu Gly Tyr Pro Ile Thr Asp Asp Leu  
 85 90 95  
 Asp Ile Tyr Thr Arg Leu Gly Gly Met Val Trp Arg Ala Asp Ser Lys  
 100 105 110  
 Gly Asn Tyr Ala Ser Thr Gly Val Ser Arg Ser Glu His Asp Thr Gly  
 115 120 125  
 Val Ser Pro Val Phe Ala Gly Gly Val Glu Trp Ala Val Thr Arg Asp  
 130 135 140  
 Ile Ala Thr Arg Leu Glu Tyr Gln Trp Val Asn Asn Ile Gly Asp Ala  
 145 150 155 160  
 Gly Thr Val Gly Thr Arg Pro Asp Asn Gly Met Leu Ser Leu Gly Val  
 165 170 175  
 Ser Tyr Arg

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 216 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

CGC GCT GAC TCC AAA GGC AAC TAC GCT TCT ACC GGC GTT TCC CGT AGC 48  
 Arg Ala Asp Ser Lys Gly Asn Tyr Ala Ser Thr Gly Val Ser Arg Ser  
 1 5 10 15  
 GAA CAC GAC ACT GGC GTT TCC CCA GTA TTT GCT GGC GGC GTA GAG TGG 96  
 Glu His Asp Thr Gly Val Ser Pro Val Phe Ala Gly Gly Val Glu Trp  
 20 25 30  
 GCT GTT ACT CGT GAC ATC GCT ACC CGT CTG GAA TAC CAG TGG GTT AAC 144  
 Ala Val Thr Arg Asp Ile Ala Thr Arg Leu Glu Tyr Gln Trp Val Asn  
 35 40 45  
 AAC ATC GGC GAC GCG GGC ACT GTG GGT ACC CGT CCT GAT AAC GGC ATG 192  
 Asn Ile Gly Asp Ala Gly Thr Val Gly Thr Arg Pro Asp Asn Gly Met  
 50 55 60  
 CTG AGC CTG GGC GTT TCC TAC CGC 216  
 Leu Ser Leu Gly Val Ser Tyr Arg  
 65 70

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 72 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine.

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

Arg Ala Asp Ser Lys Gly Asn Tyr Ala Ser Thr Gly Val Ser Arg Ser  
1 5 10 15

Glu His Asp Thr Gly Val Ser Pro Val Phe Ala Gly Gly Val Glu Trp  
20 25 30

Ala Val Thr Arg Asp Ile Ala Thr Arg Leu Glu Tyr Gln Trp Val Asn  
35 40 45

Asn Ile Gly Asp Ala Gly Thr Val Gly Thr Arg Pro Asp Asn Gly Met  
50 55 60

Leu Ser Leu Gly Val Ser Tyr Arg  
65 70

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 159 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

ACT GGC GTT TCC CCA GTA TTT GCT GGC GGC GTA GAG TGG GCT GTT ACT 48  
 Thr Gly Val Ser Pro Val Phe Ala Gly Gly Val Glu Trp Ala Val Thr  
 1 5 10 15

CGT GAC ATC GCT ACC CGT CTG GAA TAC CAG TGG GTT AAC AAC ATC GGC 96  
 Arg Asp Ile Ala Thr Arg Leu Glu Tyr Gln Trp Val Asn Asn Ile Gly  
 20 25 30

GAC GCG GGC ACT GTG GGT ACC CGT CCT GAT AAC GGC ATG CTG AGC CTG 144  
**Asp Ala Gly Thr Val Gly Thr Arg Pro Asp Asn Gly Met Leu Ser Leu**  
 35 40 45

GGC GTT TCC TAC CGC 159  
Gly Val Ser Tyr Arg  
50

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 8:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SÉQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 53 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

## (xi) DESCRIPTION DE LA SÉQUENCE: SEQ ID NO: 8:

Thr Gly Val Ser Pro Val Phe Ala Gly Gly Val Glu Trp Ala Val Thr  
1 5 10 15

Arg Asp Ile Ala Thr Arg Leu Glu Tyr Gln Trp Val Asn Asn Ile Gly  
20 25 30

Asp Ala Gly Thr Val Gly Thr Arg Pro Asp Asn Gly Met Leu Ser Leu  
35 40 45

Gly Val Ser Tyr Arg  
50

REVENDICATIONS

1. Produit adjuvant destiné à améliorer l'activité d'une molécule lors de l'administration à un hôte, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une partie de la protéine P40 de Klebsiella pneumoniae ou une protéine présentant au moins 80% d'homologie avec la protéine P40 de Klebsiella pneumoniae.
2. Produit adjuvant selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend une protéine présentant la séquence ID n° 2 ou présentant au moins 80% d'homologie avec cette séquence.
3. Produit adjuvant selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il consiste en la séquence comprise entre les amino-acides 1 à 179 de la protéine P40 de K. pneumoniae, ou une séquence présentant au moins 80% d'homologie avec la séquence comprise entre les amino-acides numérotés 1 et 179 de la séquence de la protéine P40 de K. pneumoniae.
4. Produit adjuvant selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il consiste en la séquence comprise entre les amino-acides 108 à 179 de la protéine P40 de K. pneumoniae ou une séquence présentant au moins 80% d'homologie avec la séquence comprise entre les amino-acides numérotés 108 et 179 de la protéine P40 de K. pneumoniae.
5. Produit adjuvant selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il consiste en la séquence comprise entre les amino-acides numérotés 127 à 179 de la protéine P40 de K. pneumoniae ou une séquence présentant au moins 80% d'homologie avec la séquence comprise entre les amino-acides numérotés 127 à 179 de la protéine P40 de K. pneumoniae.
6. Protéine ou peptide présentant l'une des séquences ID n° 2, ID n° 4, ID n° 6 ou ID n° 8.
7. Séquence d'ADN codant pour un produit selon l'une des revendications 1 à 6.
8. Complexe immunogène du type comprenant un élément immunogène, associé à un adjuvant augmentant l'intensité de la réponse immunitaire, caractérisé en ce que l'élément immunogène est un antigène ou un haptène, et l'adjuvant comprend un produit selon l'une des revendications 1 à 6.

9. Complexe immunogène selon la revendication 7, caractérisé en ce que l'élément immunogène est associé à l'adjuvant par une liaison covalente.

10. Complexe immunogène selon l'une des revendications 8 ou 9, caractérisé en ce que l'élément immunogène est constitué d'un fragment de la protéine G du RSV.

10. Complexe immunogène selon l'une des revendications 8 à 10, caractérisé en ce que l'élément immunogène, associé à l'adjuvant, est fusionné avec une protéine qui est un récepteur à une protéine sérique, en particulier à la sérumalbumine humaine.

12. Procédé pour augmenter l'immunogénicité d'un antigène ou d'un haptène, caractérisé en ce qu'on associe ledit antigène ou haptène à un adjuvant selon l'une des revendications 1 à 6, sous forme d'un complexe selon l'une des revendications 8 à 11.

15. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce qu'on associe l'antigène ou l'haptène à l'adjuvant par couplage chimique.

14. Procédé selon l'une des revendications 12 ou 13, caractérisé en ce que l'antigène ou l'haptène est fusionné par génie génétique à l'adjuvant.

20. 15. Vaccin caractérisé en ce qu'il contient un complexe selon l'une des revendications 8 à 11, susceptible d'être préparé par le procédé selon l'une des revendications 12 à 14.

16. A titre de médicament, séquence d'ADN selon la revendication 7.

25. 17. Utilisation d'une séquence d'ADN selon la revendication 7 pour la préparation d'un vaccin utile par voie intramusculaire ou intradermique.

18. Procédé de préparation d'un produit adjuvant selon l'une des revendications 1 à 6, à partir de membranes de bactéries du genre *Klebsiella pneumoniae*, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes de :

a) précipitation des lipopolysaccharides par addition de détergent et d'un sel de cation divalent et récupération du surnageant,

30. b) précipitation des protéines du surnageant et remise en suspension du culot,

- c) chromatographie de la suspension sur échangeur d'anions et récupération des fractions contenant le produit adjuvant,
- d) chromatographie sur échangeur de cations et récupération de la fraction contenant le produit adjuvant,
- 5 e) concentration de la fraction obtenue à l'issue de l'étape d) pour récupérer un produit adjuvant sous forme de protéine, essentiellement dépourvu de liposaccharides.

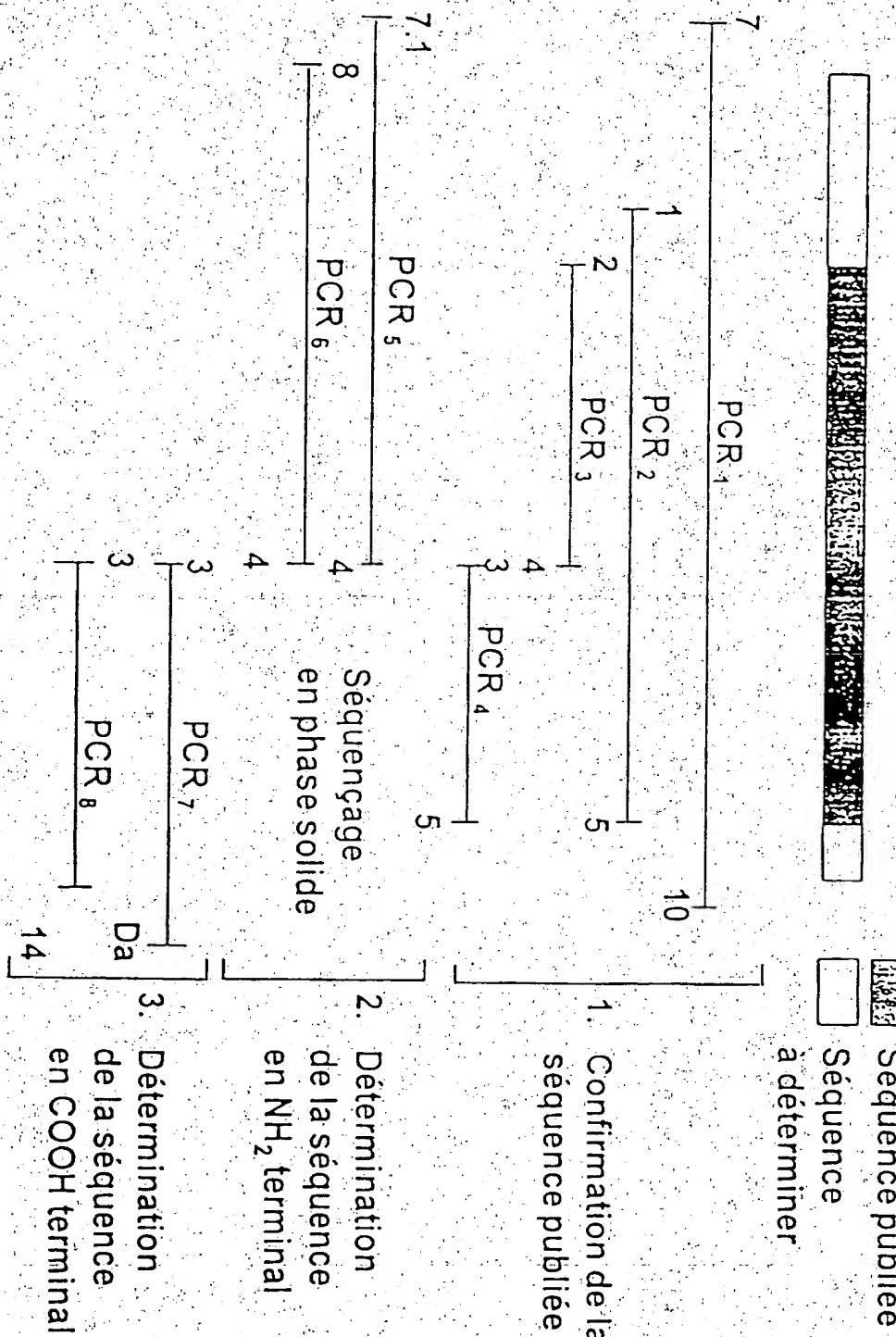


Figure 1

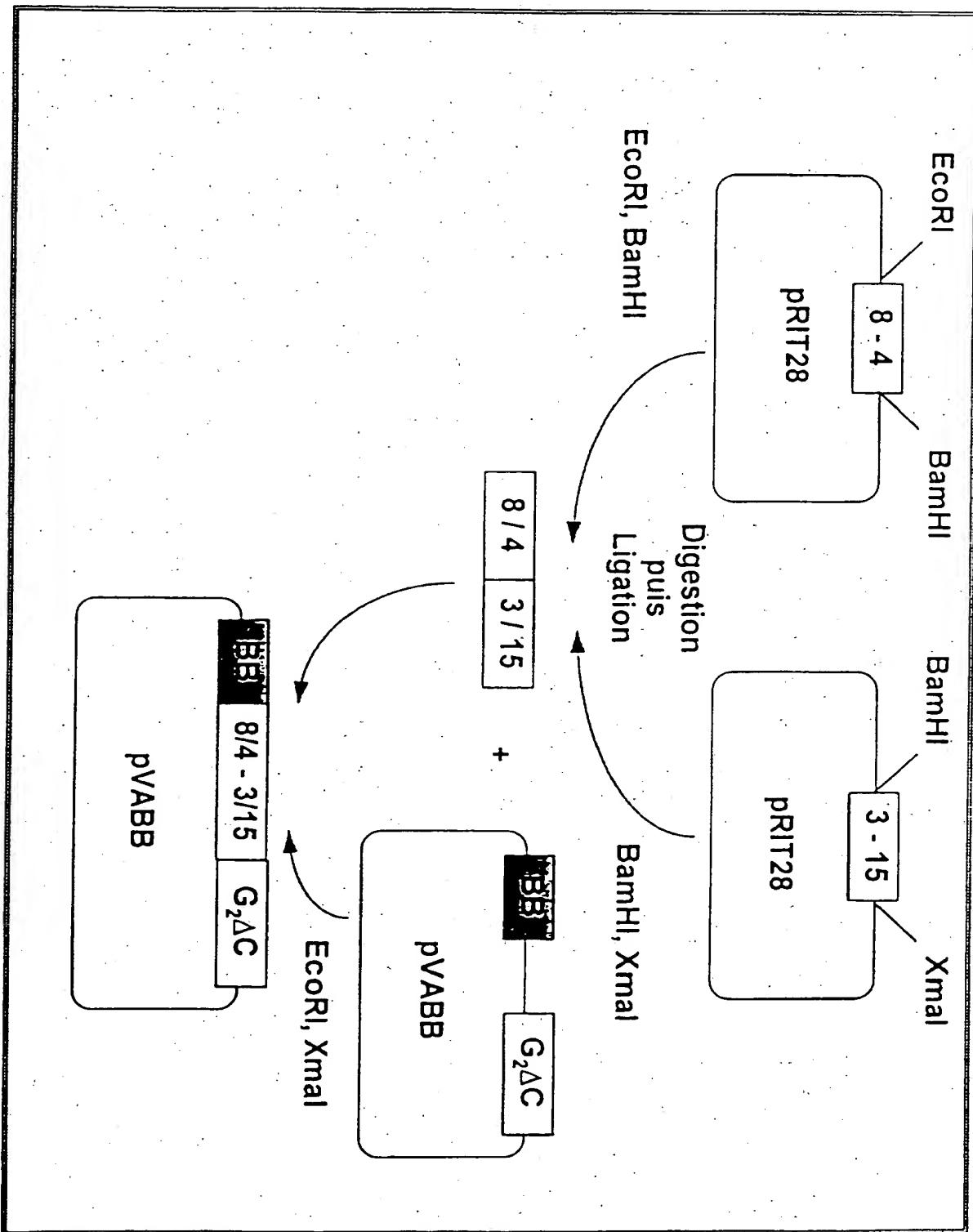


Figure 2

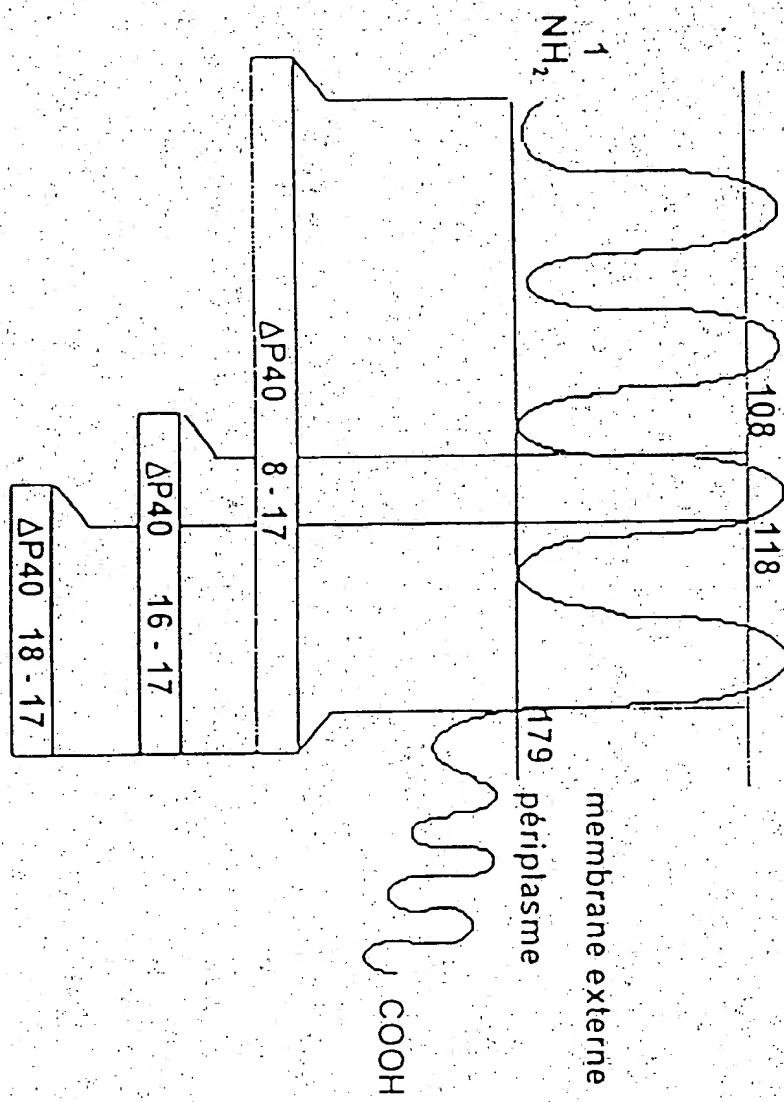


Figure 3

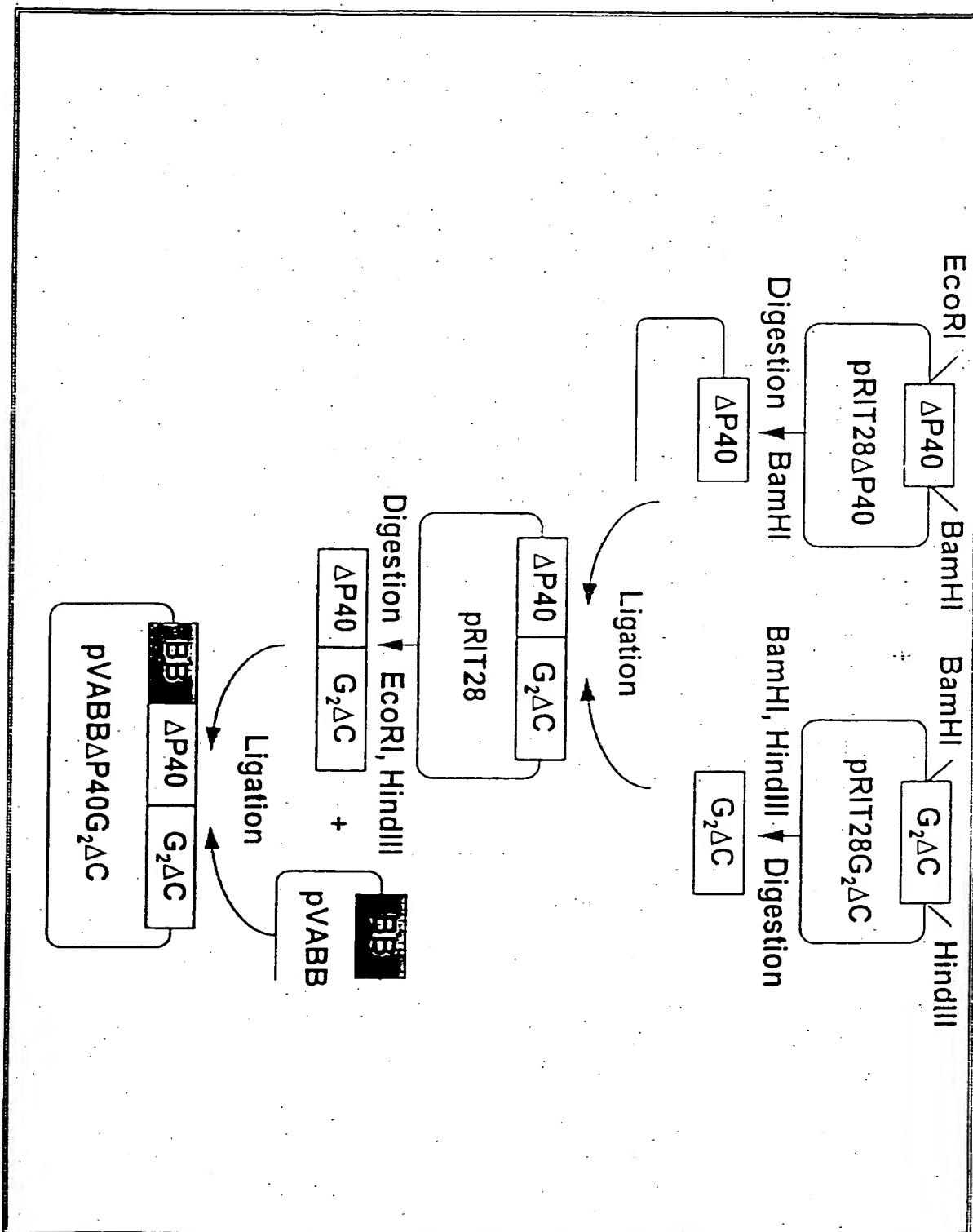


Figure 4

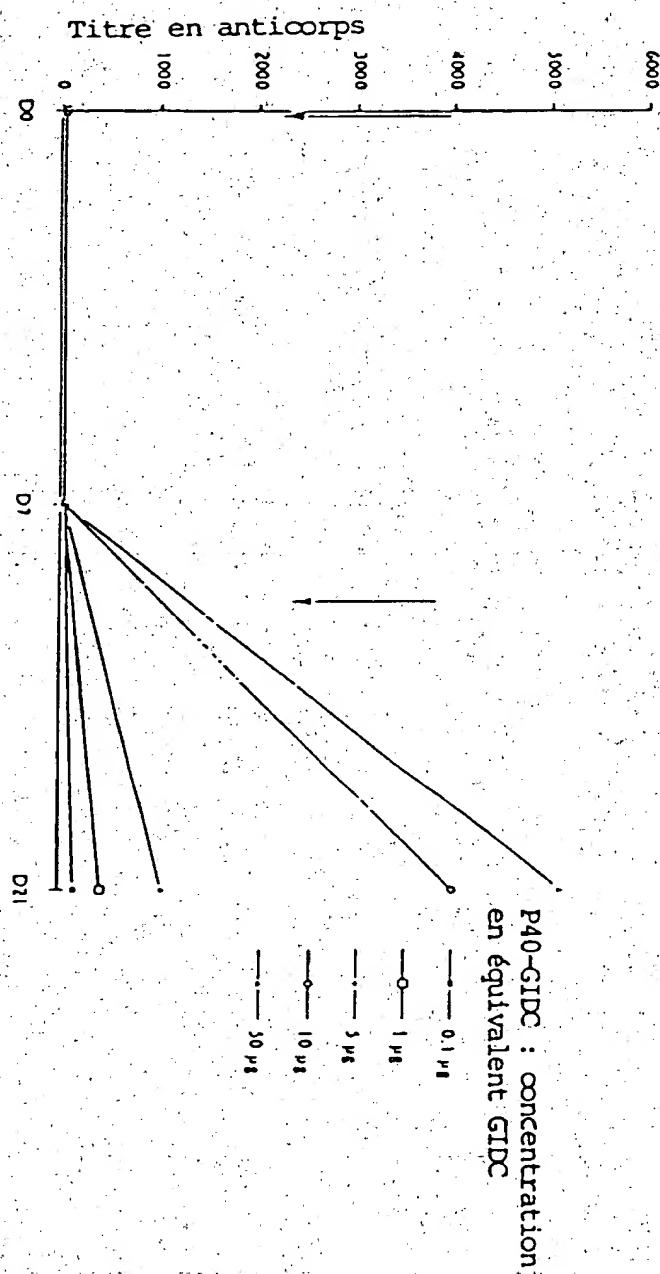


Figure 5

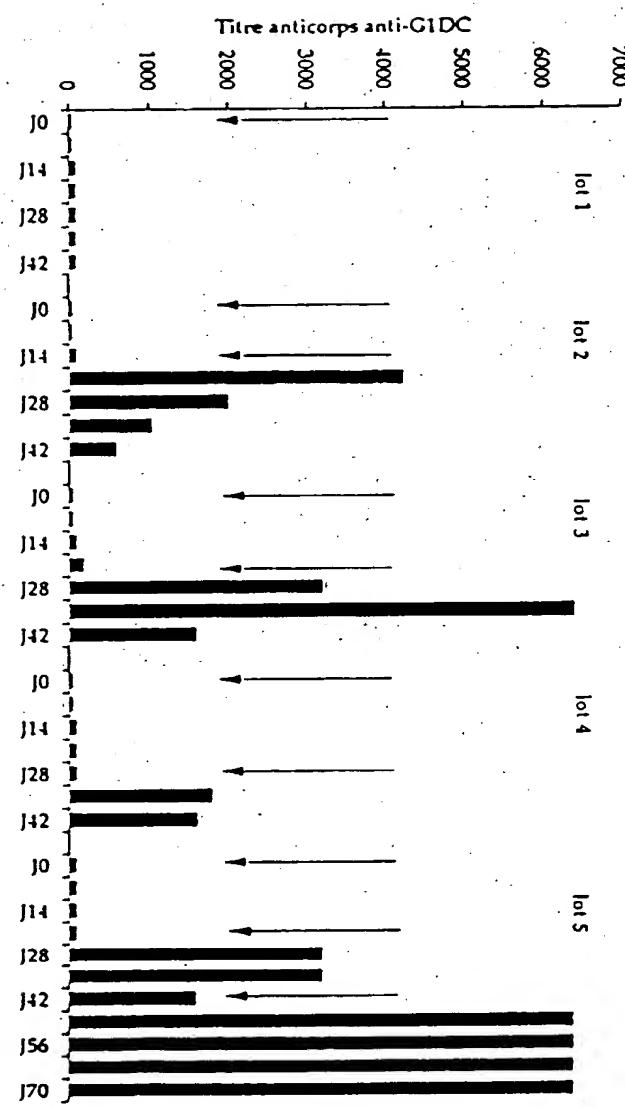


Figure 6

RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche2726472  
N° d'enregistrement  
nationalFA 506026  
FR 9413306

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes.	
X	JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY, vol. 137, no. 8, Août 1991 pages 1911-1921, LAWRENCE J.G. ET AL. 'Molecular and evolutionary relationships among enteric bacteria'	7
Y	* le document en entier * ---	1,8-15
Y	WO-A-89 05823 (THE UPJOHN COMPANY) * le document en entier * ----	1,8-15

DOMAINES TECHNIQUES  
RECHERCHES (Int. CL 6)C07K  
A61K

3

Date d'achèvement de la recherche

12 Juillet 1995

Examinateur

Moreau, J

## CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS

- X : particulièrement pertinents à lui seul
- Y : particulièrement pertinents en combinaison avec un autre document de la même catégorie
- A : pertinents à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général
- : divulgation non écrite
- P : document intercalaire

T : théorie ou principe à la base de l'invention  
 E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure  
   à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date  
   de dépôt ou qu'à une date postérieure.

D : cité dans la demande

L : cité pour d'autres raisons

&amp; : membre de la même famille, document correspondant